

(19) JAPANESE PATENT OFFICE
(12) PATENT JOURNAL (B2)
(11) KOKOKU PATENT NO. 2574732

(51) Int. Cl.⁶: A61K 7/00
7/48
C07K 1/12
14/78

Sequence Nos. for Office Use: 8517-4H
8517-4H

(21) Application No.: HEI 3[1991]-59752

(22) Application Date: February 28, 1991

(65) Kokai No.: HEI 6[1994]-24935

(43) Kokai Date: February 1, 1994

(24) Registration Date: October 24, 1996

(45) Publication Date: January 22, 1997

No. of Inventions: 1 (Total of 7 pages)

(54) Title: COLLAGEN METABOLISM ACTIVATOR

(72) Inventors: Shintaro Inoue
4-20-1 Hisashi
Odawara, Kanagawa

Motoi Hayase
5-6-11 Shiunjo
Higashiyodokawa-ku, Osaka

Masanori Nakada
Nishishiro Mansion A-302
3-21-2 Hayakawa
Odawara, Kanagawa

Tadashi Matsui
1-10-1 Yurigaoka
Nimiya, Naka
Kanagawa

(73) Applicant: 000000952
Kanebo Ltd.
5-17-4 Kuroda
Kuroda-ku, Tokyo

Examiner: Yoshiko Fuji

(56) Reference Cited: Japanese Kokai Patent No. SHO 57[1982]-4909 (JP, A)

[There are no amendments to this patent application.]

Claim

Collagen metabolism activator containing a sulfuric acid hydrolyzate of silk fibers with a molecular weight below 500.

* * *

Language Services Unit
Phoenix Translations
May 18, 2004

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特許公報 (B 2)

(11)特許番号

第2574732号

(46)発行日 平成9年(1997)1月22日

(24)登録日 平成8年(1996)10月24日

| (51)Int.Cl ⁶ | 識別記号 | 序内整理番号 | P I | 技術表示箇所 |
|-------------------------|------|---------|-------------|--------|
| A 61 K 7/00 | | | A 61 K 7/00 | K |
| | 7/48 | | 7/48 | |
| C 07 K 1/12 | | 8517-4H | C 07 K 1/12 | |
| 14/78 | | 8517-4H | 14/78 | |

請求項の数1(全7頁)

| | | | |
|----------|-----------------|----------|--|
| (21)出願番号 | 特願平3-59752 | (73)特許権者 | 000000952 笠筋株式会社 東京都墨田区墨田五丁目17番4号 |
| (22)出願日 | 平成3年(1991)2月28日 | (72)発明者 | 斧上 新太郎 神奈川県小田原市寿町4丁目20番1号 |
| (65)公開番号 | 特開平6-24935 | (72)発明者 | 早瀬 基 大阪市東淀川区下新庄5丁目6番11号 |
| (43)公開日 | 平成6年(1994)2月1日 | (72)発明者 | 中田 正典 神奈川県小田原市早川3丁目21番地の2 西城マンションA-302 |
| | | (72)発明者 | 松井 正 神奈川県中郡二宮町百合が丘1丁目10番 1号 |
| | | 審査官 | 百士 美香 |
| | | (56)参考文献 | 特開昭57-4909 (J P, A) |

(54)【発明の名称】 コラーゲン代謝試活剤

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】分子量が500以下の綿繊維の硫酸加水分解物を含むコラーゲン代謝試活剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は綿繊維より得られるコラーゲン代謝試活剤に関する。さらに詳しくは、分子量が500以下綿繊維の硫酸加水分解物を含む、細胞のコラーゲナーゼ産生を促進するコラーゲン代謝試活剤に関する。

【0002】

【従来の技術】コラーゲンが異常に蓄積する疾患(肝および肺線維症、ケロイド、肥厚性瘢痕および瘢痕症等)では、コラーゲンの合成と分解のバランスが失われていることが示唆されており、例えば肝硬変症に伴う肝線維

2

化はコラーゲン生合成増加とコラーゲン分解能の低下(Biochemical Journal, 118巻, 229頁, 1970年およびLife Sciences, 30巻, 1379頁, 1982年参照)により生ずる。このうち、コラーゲン分解能の低下は、各組織や皮膚線維芽細胞のコラーゲナーゼ活性の低下によると考えられており(皮膚, 14巻, 217頁, 1972年, Journal of Clinical Investigation, 56巻, 1175頁, 1975年およびLife Sciences, 30巻, 1379頁, 1982年参照)、コラーゲナーゼ活性の増強が望まれている。

【0003】一方、上記のような病態のみならず生理的条件に於いても、老化に伴い皮膚コラーゲンの代謝回転が低下することが知られており(現代化学, 12月号, 36頁, 1990年参照)、この様な場合も、コラーゲンの代謝低下を防止するためにコラーゲナーゼ活性の増強が望まれる。

3

【0004】また、老化に伴い架橋コラーゲンの割合が増すと共に、コラゲナーゼ分解に抵抗性を示すようになり（*Aging of the Skin*、121頁、1989年、Raven Press, New York）、一定量のコラーゲンを分解するためには、より多くのコラゲナーゼが必要となる。

【0005】コラゲナーゼは、結合組織中の間質型コラーゲン（I型、II型、およびIII型コラーゲン）を分解する際の律速酵素であり、コラーゲンの代謝に重要な役割を果たしている。コラゲナーゼは、前駆体であるプロコラゲナーゼとして細胞より分泌され、生体内ではその後プラスミンやストロムライシン等のタンパク分解酵素によってコラゲナーゼに活性化される（*Biochemical Journal*、166卷、21頁、1977年および *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*、86卷、2632頁、1989年参照）と考えられているが、プロコラゲナーゼは一般的に得ることが困難で、充分に研究が進んでいるとは言えず、その产生制御や活性化機構等まだ未知の点が多い。

【0006】以上のことから、コラーゲン代謝を賦活する為には、プロコラゲナーゼの产生を促進する物質が有効と考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的とするところは、組織への浸透性に有利な低分子物質による、病的あるいは生理的に低下したコラーゲン代謝の賦活剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】上述の目的は、分子量が500以下の精練維の硫酸加水分解物を含むコラーゲン代謝賦活剤によって達成される。

【0009】精練維の部分加水分解物、特に、可溶化した水溶性シルクペプチドは皮膚化粧料等に用いられる公知物質であり、例えばその製造法として特公昭58-17763号公報（分子量分布：1500～5000）、特公昭59-31520号公報（平均重合度：2～20）、特公昭60-41043号公報（分子量分布：200～400）等が知られている。

【0010】本発明に於いて用いられる精練維の硫酸加水分解物としては、精練精練維に40～60重量%硫酸を直接添加し、60℃で1～4時間処理する（特公昭60-41043号公報）か、或いは精練維を塩化カルシウム等により予め可溶化フィロイン溶液とした後、硫酸を添加（特公昭59-31520号公報）することにより得た加水分解物等が使用できる。

【0011】尚、塩酸、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム等の酸あるいはアルカリ加水分解や、パンクレアチン等のプロテアーゼによる加水分解では、本発明の目的とするプロコラゲナーゼの产生促進効果は得られない。

【0012】本発明のコラーゲン代謝賦活剤を、セファデックスG-25™ファイン（ファルマシア社製）で分

4

画した結果、プロコラゲナーゼの产生促進活性をもつのは主に、塩類、アミノ酸およびオリゴペプチドの溶出する分子量500以下の低分子画分であることが分かった。

【0013】本発明のコラーゲン代謝賦活剤としては、皮膚線維芽細胞の存在する真皮層（結合組織）への作用が大きいので、この分子量500以下のものが好ましい。

【0014】本発明のコラーゲン代謝賦活剤を、その使用目的に応じて、通常用いられる公知の成分に配合することによって、液剤、固形剤、半固形剤等の各種剤形に調製することが可能で、好ましい組成物として軟膏、ゲル、クリーム、スプレー剤、貼付剤、ローション等が挙げられる。

【0015】その例として、本発明のコラーゲン代謝賦活剤を、ワセリン等の炭化水素、ステアリルアルコール等の高級アルコール、ミリスチン酸イソプロピル等の高級脂肪酸低級アルキルエチル、ラノリン等の動物性油脂、グリセリン等の多価アルコール、グリセリン脂肪酸エチル、モノステアリン酸ポリエチレングリコール等の界面活性剤、無機塩、糖、樹脂、水および要すればバラオキシ安息香酸メチル、バラオキシ安息香酸ブチル等の防腐剤に混合することによって、化粧品や医薬品を製造することができる。

【0016】その際のコラーゲン代謝賦活剤の添加量は剤形により異なるが、絹維維として、5～4重量%含むコラーゲン代謝賦活剤の場合、適用する組成物全量を基準として通常0.1～1.0重量%、好ましくは1～5重量%含有することが望ましい。

【0017】

【発明の効果】本発明のコラーゲン代謝賦活剤を、種々のヒト皮膚線維芽細胞の培養系に添加すると、プロコラゲナーゼの产生量が促進される（後記試験例-1および2参照）。更に、本発明のコラーゲン代謝賦活剤は、加齢した皮膚線維芽細胞に対し、加齢に伴って低下したプロコラゲナーゼの产生量を回復させる（後記試験例-3参照）。

【0018】従って、本発明のコラーゲン代謝賦活剤は、線維芽細胞に作用し、コラゲナーゼ活性を増強することにより、病的あるいは生理的に低下したコラーゲンの代謝を賦活することができる。

【0019】

【実施例】実施例1

【0020】塩化カルシウムの60重量%水溶液400mlに、精練精原料5.6gを加熱溶解した。この際、溶解を容易にするため、エチルアルコール160mlを添加した。次いで、これを24時間透析し濃縮後、18重量%の可溶化フィロイン水溶液312mlを得た。

【0021】このうち235mlに濃硫酸165mlをゆっくりと加え、60℃で6時間加温した。次いでこれ

に水を加え終量1.8mlとし、室温で一夜放置後水冷しながら水酸化ナトリウムで中和、滤過することにより本発明のコラーゲン代謝賦活剤2！（2.1重量%相当のフィブロインを含む）を得た。

【0022】（試験例-1）

正常ヒト線維芽細胞株（白人女性の皮膚より採取されたDetroit-551（ATCC CCL 110））を1.0容積%ウシ胎仔血清（以下FBSと略記）を含むMEM培地にて1×10⁴個/mlに調整し、6穴プレートに2mlずつ播種して、5%炭酸ガス、飽和水蒸気下、37°Cで培養した。

【0023】尚、MEM培地は、大日本製薬社製最少必須培地1.0-1.01に、それぞれ終濃度0.1重量%ラクトアルブミン酵素水解物（シグマ社製）、1容積%非必須アミノ酸、1mMビルビン酸ナトリウム（以上いずれも大日本製薬社製）、0.12重量%炭酸水素ナトリウムおよび50mg/mlストレプトマイシンを添加して調製した。

【0024】24時間後培養液を吸引除去し、終濃度0.6容積%FBSを添加したMEMで細胞を2回洗浄した後、同培地1.9mlを加える。これに、ボアーサイズが0.2μmのニトロセルロース膜（アドバンテック東洋製、DISMIC-25）で滤過滅菌した実施例1のコラーゲン代謝賦活剤を添加（終濃度5容積%）し、7日間同様に培養して培養上清を得た。

【0025】本発明に於いて用いられる、綿織維の硫酸加水分解物のプロコラーゲナーゼ産生促進活性を調べるのに先立って、培養上清中にプロコラーゲナーゼと同時に産生されている、コラーゲナーゼインヒビター（蛋白質）の除去を行う。

【0026】コラーゲナーゼインヒビターの除去：得られた培養上清250μlに10mMトリス塩酸緩衝液（4°CでpH7.8に調整、1mM塩化カルシウム、0.05容積%Brij-35（C.I.社製ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル）を含む）を1.75ml加え、同緩衝液で平衡化したON-セファロースCL-6B™（ファルマシア社製、ベッド容積0.5ml）に供した。

【0027】次に、1.25mM食塩を含む同緩衝液0.5mlにてインヒビターを除去（計4回、終量2ml）し、500mM食塩を含む同緩衝液り、5mlにてプロコラーゲナーゼを回収（計4回、終量2ml）した。

【0028】プロコラーゲナーゼ産生量の定置：本実験で用いた細胞では、産生されるコラーゲナーゼはそのままで活性をもたないプロコラーゲナーゼとして回収されるので、プロコラーゲナーゼ産生量は、トリプシンで活性化して得られるコラーゲナーゼ活性として定置した。トリプシンによる活性化法、およびフルオレッセインイソチオシアネートで標識されたI型コラーゲン（コスモバイオ社製）を基質としたコラーゲナーゼ活性の測定法は、永井らの方法（Japanese Journal of Inflammation, 4巻、123頁、1984年参照）に準じた。

【0029】なお1単位は、35°Cで1分間に1μgのI型コラーゲンを分解する酵素量を示す。

【0030】得られた培養上清中のプロコラーゲナーゼ量を定置した結果、対照（無添加）では1.0.8±0.1単位/ml（平均値±標準誤差、n=3）に対し、実施例1で得られたコラーゲン代謝賦活剤添加では、3.7.1±0.3単位/ml（平均値±標準誤差、n=3）を示し、プロコラーゲナーゼの産生が促進されたことが分かった。

【0031】実施例2

綿晒ノイル10gを4.0容積%硫酸5.0mlに浸漬し、60°Cで12時間加熱した後、200mlの冷水を加え1夜室温で放置した。次いで、10N水酸化ナトリウム溶液を徐々に加えて中和した後、滤過して上清液330ml（3重量%相当のフィブロインを含む）を得た。

【0032】（試験例-2）

正常ヒト線維芽細胞株として、いずれも白人女性皮膚より採取されたDetroit-551（ATCC CCL 110）、Detroit-548（ATCC CCL 116）および、BUD-8（ATCC CRL1554）を用い、実施例2で得られたコラーゲン代謝賦活剤の添加効果を試験例-1と同様にして調べた結果を表1に示す。

【0033】

【表1】

| 細胞株 | プロコラーゲナーゼ産生量（単位/ml） | |
|-------------|---------------------|-----------------|
| | 対照 | 実施例2のコラーゲン代謝賦活剤 |
| Detroit-551 | 1.8.9 | 4.0.7 |
| Detroit-548 | 2.8 | 4.4.5 |
| BUD-8 | 1.2 | 1.7.8 |
| 平均値（n=2） | | |

【0034】調べた3株の正常ヒト線維芽細胞に対し、50本発明のコラーゲン代謝賦活剤は、プロコラーゲナーゼの

7 產生を促進することが分かった。

【0035】(試験例-3)

正常ヒト線維芽細胞として継代日数の異なるDetroit-551細胞を用い、加齢とコラゲナーゼ産生量およびそれに対する本発明のコラーゲン代謝賦活剤の添加効果を調べた。

【0036】Detroit-551細胞入高後、32、69、73、87、112および132日継代培養したもの用い、コラーゲン代謝賦活剤として、滅菌した実施例本

8 * 2のコラーゲン代謝賦活剤を用い、添加後の培養日数を9日間とした以外は、全て試験例-1と同様に培養して培養上清を得た。

【0037】得られた培養上清から、試験例-1と同様の方法で、インヒビターを除去し、プロコラゲナーゼ産生量を測定した。結果を表2に示す。

【0038】

【表2】

| 継代日数 | プロコラゲナーゼ産生量(単位/mL) | |
|----------|--------------------|-----------------|
| | 対照 | 実施例2のコラーゲン代謝賦活剤 |
| 32 | 30.5 ± 8.4 | 77.0 ± 11.2 |
| 69 | 31.9 ± 8.5 | 87.3 ± 3.4 |
| 73 | 19.0 ± 4.6 | 66.9 ± 12.1 |
| 87 | 16.9 ± 1.8 | 79.9 ± 8.4 |
| 112 | 9.8 ± 4.1 | 69.5 ± 21.8 |
| 132 | 8.4 ± 1.8 | 48.0 ± 4.3 |
| 平均値±標準誤差 | | n=3 |

【0039】実施例2のコラーゲン代謝賦活剤の添加により、加齢に伴って低下した線維芽細胞のプロコラゲナーゼ産生量が回復することが明らかとなった。

【0040】(試験例-4)

実施例1および実施例2で得られたコラーゲン代謝賦活剤を、0.1N酢酸で平衡化したゲル通過カラム(セファデックスG-25™ファイン、直徑4cm、高さ20cm、充填容積250mL)に供し、Detroit-551に対して、プロコラゲナーゼの產生を促進させる活性の溶出パターンを調べた。

【0041】実施例1および実施例2で得られた両コラーゲン代謝賦活剤共に、活性のピークは電気伝導度(バイオラッド社製Gradient Monitor Model 1710にて測定)のピークと全く同位置に溶出され、低分子物質であることが予想された。

【0042】溶解液として、1容積%トリフルオロ酢酸を含む4.5容積%アセトニトリルを用い、220nmの紫外吸収を指標として、上記ゲル通過によって得られた活性画分を、高速液体クロマトグラフィー(ゲル浸透G3000 PW-XLカラム、京セラ(株))に供し、※

「親水性成分」

バラオキシ安息香酸メチル

プロピレングリコール

精製水

0.1g

6.7g

41.1g

【0047】

「親油性成分」

※分子量の推定をおこなった結果、その分子量は約500以下であった。

【0043】尚、実施例1および実施例2で得られた両コラーゲン代謝賦活剤共に、ゲル通過カラム(セファデックスG-25™ファイン)で分析した結果、元の絹織維あるいはフィブロインの約9.5%(実施例1)および約9.0%(実施例2)が、分子量500以下のペプチドおよびアミノ酸に分解されていた。

【0044】以下に本発明のコラーゲン代謝賦活剤を応用した組成物の处方例を示す。

【0045】处方例1-軟膏

実施例1のコラーゲン代謝賦活剤3gと下記親水性成分とを、湯浴で80°Cに加温して混合し、これを、80°Cに加温した下記の親油性成分混合物に搅拌しながら徐々に加えた。次に、ホモジナイザー(TOKUSYUKIKA KOGYO製)で2分半強しく搅拌(2500rpm)して各成分を充分乳化分散させた後、搅拌しながら徐々に冷却し、100g中に3重量%のコラーゲン代謝賦活剤を含む軟膏を得た。

【0046】

| | |
|--|-------|
| 9 | 10 |
| スクワラン | 4.7g |
| 白色ワセリン | 24.0g |
| ステアリルアルコール | 8.7g |
| ミリスチン酸イソプロピル | 6.0g |
| モノステアリン酸ポリエチレングリコール (商品名NIKKOL MYS-45、日本サーファクタント工業(株)製) | 1.3g |
| ポリエチレンアルキルエーテルリン酸 (商品名NIKKOL DDP-2、日本サーファクタント工業(株)製) | 2.3g |
| モノステアリン酸グリセリン | 2.0g |
| バラオキシ安息香酸ブチル | 0.1g |

[0048]

处方例2-ローション

| | 重量% |
|-----------------|------|
| 実施例2のコラーゲン代謝賦活剤 | 1.0 |
| エタノール | 10.0 |
| 乳酸 | 0.3 |
| クエン酸ナトリウム | 0.1 |
| グリセリン | 2.0 |
| 防腐剤、香料および界面活性剤 | 適量 |
| 精製水 | 残量 |

100%

[0049]

处方例3-入浴剤

| | 重量% |
|-----------------|------|
| 実施例1のコラーゲン代謝賦活剤 | 5.0 |
| 炭酸水素ナトリウム | 45.0 |
| 香料および界面活性剤 | 適量 |
| 有機色素 | 適量 |
| 無水硫酸ナトリウム | 適量 |

100%

[0050] (試験例-5)

垂直型拡散セル装置(図1参照、Kercso Engineering社製: 有効面積8cm²)にラット(Wister系雄ラット、10週令、体重200~230g)の腹部剥離皮膚を装着し、37°C空気恒温槽に置いた。donor側には蒸留水または本発明の組成物の2倍あるいは4倍希釈液をそれぞれ1ml、receptor側には脱気蒸留水(約4.5ml)を供した。

[0051] 6時間後にreceptor溶液を全量採取し、ただちに-20°Cで冷凍保存した。再溶解後、凍結乾燥を

行い、MEM培地2mlに再溶解し、ポアサイズ0.2μmのフィルターで滤過滅菌後、コラーゲン代謝賦活剤の添加効果を試験例-1と同様にして調べた結果を表3に示す。

[0052] コラーゲン代謝賦活剤の2倍希釈液のreceptor溶液に高いプロコラゲナーゼ産生促進作用が見られた。

49 [0053]

【表3】

| コラーゲン代謝賦活剤プロコラゲナーゼ産生促進活性のラット皮膚透過性 | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 皮膚透過試験検体 | プロコラゲナーゼ産生促進活性 (プロコラゲナーゼ量, U/mg) |
| 蒸留水 | 14.7 ± 1.4 |
| 実施例2のコラーゲン代謝賦活剤 (2倍希釈) | 28.1 ± 0.9** |
| (4倍希釈) | 15.8 ± 1.4 |
| 平均値±標準偏差 (n=3) | |
| 培養系のコントロール (無添加) ; 13.5 ± 0.5 (U/mg) | |
| *蒸留水群に対し、P<0.01で有意差あり (Duncan法)。 | |

【0054】比較例1, 2

綿晒ノイル10gを3.5容積%硝酸あるいは1.9容積%塩酸50mlに浸漬し、60°Cで12時間加熱した後、200mlの冷水を加え1夜室温で放置した。次いで、10N水酸化ナトリウム溶液を徐々に加えて中和した後、過過して上清液330ml (3重量%相当のフィブロインを含む)を得た (比較例1, 2)。

【0055】なお、HPLCにより、上記綿晒水分解物*

*が充分低分子化されていること (平均分子量500以下) が確認されている。

【0056】(試験例-6)

20 比較例1, 2の綿晒水分解物および実施例2のコラーゲン代謝賦活剤の添加効果を試験例-1と同様にして調べた結果を表4に示す。

【0057】

【表4】

| 各分解条件による綿晒水分解物のプロコラゲナーゼ産生促進活性の相違 | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 綿晒水分解物 (5%添加) | プロコラゲナーゼ産生促進活性 (プロコラゲナーゼ量, U/mg) |
| 硫酸分解物 (実施例2) | 10.0 ± 0.2** |
| 硝酸分解物 (比較例1) | 3.6 ± 0.7** |
| 塩酸分解物 (比較例2) | 2.3 ± 0.2 |
| 平均値±標準偏差 (n=3) | |
| 培養系のコントロール (無添加) ; 2.1 ± 0.2 (U/ml) | |
| **無添加群に対し、P<0.01で有意差あり (Duncan法)。 | |

【図面の簡単な説明】

【図1】試験例5で使用した、垂直型拡散セル装置を表す図である。

【符号の説明】

1 テフロン製ふた部
2 サンプリング口

40 3 薬物試料

4 皮膚

5 O-リング

6 レセプター組

7 搾持子

【图1】

